

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-123392

(43)Date of publication of application : 27.05.1988

(51)Int.Cl.

C12P 19/26

C12P 19/04

(21)Application number : 61-269734

(71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK

(22)Date of filing : 14.11.1986

(72)Inventor : HASHIMOTO MASAMICHI

SAEGUSA HARUHISA

CHIBA SUSUMU

KITAGAWA HIROYUKI

MIYOSHI TERUZO

## (54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

## (57)Abstract:

PURPOSE: To produce hyaluronic acid in high yield, stably and in uniform yield, by cultivating a bacterium belonging to the genus Streptococcus, from which nutrition demanding properties are partially removed, in a nutritive medium.

CONSTITUTION: Streptococcus equi ATCC9527 is cultivated in a medium containing polypeptone, yeast essence and glucose, the cell in a logarithmic proliferation period is collected, washed and treated with N-methyl-N'-nitro-N- nitroguanidine to give Streptococcus equi FM100 (FERM-P 9027) from which nutrition demanding properties are partially removed and which can grow in an artificial synthetic medium consisting only of a medium component in which ATCC strain, parent strain, can not grow. the strain is subjected to aerated spinner culture in a nutritive medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganic salt, etc., and, if necessary, amino acid, vitamin, etc., at pH6.5W7 at 30W35° C to give hyalunonic acid.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭63-123392

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>  
C 12 P 19/26  
19/04

識別記号 庁内整理番号  
8515-4B  
A-8515-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月27日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造方法

⑮ 特 願 昭61-269734

⑯ 出 願 昭61(1986)11月14日

⑰ 発 明 者 橋 本 正 道 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社  
中央研究所内  
⑰ 発 明 者 三 枝 治 久 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社  
中央研究所内  
⑰ 発 明 者 千 葉 晋 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社  
中央研究所内  
⑰ 発 明 者 北 川 広 進 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社  
中央研究所内  
⑰ 発 明 者 三 好 照 三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社  
中央研究所内  
⑰ 出 願 人 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

明 細 書

1 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2 特許請求の範囲

- (1) 栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキスを培養し、ヒアルロン酸を生成させることを特徴とする培養法によるヒアルロン酸の製造法。
- (2) 菌株の増殖しない表1に示す培養成分から成る人工合成培養地に生育できる栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキスを培養し、ヒアルロン酸を生成させることを特徴とする培養法によるヒアルロン酸の製造法。

特開昭63-123392 (2)

成分	成分
グルコース	アミノ酸
L-アラニン	グリシン
L-アルギニン	L-ヒスチジン
L-アスパラギン	L-イソロイシン
L-アスパラギン酸	L-ロイシン
L-スチジン	L-リジン
L-グルタミン	L-メチオニン
L-グルタミン酸	L-フェニルアラニン
グリシン	L-プロリン
L-ヒスチジン	L-セリン
L-イソロイシン	L-スチジン
L-ロイシン	L-トリプトファン
L-リジン	L-チロシン
L-メチオニン	L-バリン
L-フェニルアラニン	
L-プロリン	
L-セリン	
L-スチジン	
L-トリプトファン	
L-チロシン	
L-バリン	

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、発酵法によるヒアルロン酸の製造法に関する。さらに詳しくは、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とするヒアルロン酸の製造法に関する。

## 〔従来の技術〕

従来ヒアルロン酸はニワトリのトサカ、牛の尿の硝子体又は臍帯等より抽出によつて得られていた。しかしながら抽出法によるヒアルロン酸製造は、分離精製が非常に困難等の欠点を有していた。

その欠点を改良するために、ヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を培養し、その培養液から直接ヒアルロン酸を採取する方法が開示されている（特開昭58-56692号公報、特開昭61-63294号公報）。

さらに、微生物を培養し、ヒアルロン酸を採取する方法について、培養のロットごと生成量を安定化させるため、突然変異株を用いる方法が開示

されている（特開昭61-219394号公報）。

本発明者らは、ヒアルロン酸産生能を有するストレプトコッカス属の微生物を、培養液のpH 7.5～9.0にコントロールすることにより、高分子量のヒアルロン酸を生成蓄積せしめる方法についてすでに提案した（特開昭61-170943号明細書）。

## 〔発明が解決しようとする問題点〕

微生物を培養して、ヒアルロン酸の生産を行なうと、ロットごとの生産量が不安定であり、工業的に実施する際に、大きな問題となる。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる問題を解決すべく、適々研究を行なった結果、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキが意外にも菌株よりも、高収量で、しかも収量のバラツキが少なく安定にヒアルロン酸を生成することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒア

## 特開昭63-123392 (3)

ルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とする発酵法によるヒアルロン酸の製造法である。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の発芽要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキは、ヒアルロン酸生成能を有するストレプトコッカス・エキの突然変異株の中から取得することが出来る。

例えば、ストレプトコッカス・エキ ATCC9527を用い、ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、グルコース2%の培地で、33℃で培養し、対数増殖期の菌を、低温で遠心分離により集菌し、生理食塩水を用いて、無菌的に3回洗浄する。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン50mg/mlを含むpH5.0、0.05Mリン緩衝液中、30℃で1時間培養したのち、水冷する。ついで、生理食塩水を用いて、低温で菌体を3回洗浄した後、ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、グルコース2%の培地で、33℃、3時間培養し、また生理食塩水を用いて、低温で菌体を3回洗浄する。表2に示す人工合成培地で、

33℃、7日間液体培養し、増殖してきた培養液をさらに、新しい同じ人工合成培地にうえつぎ、この操作を3回くりかえす。

次に寒天を含む同じ組成の培地上に塗布し、コロニーを分離し、ストレプトコッカス・エキFM100を得る。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、技工研菌第9027号として受託されている。ストレプトコッカスFM・100は、部分的に発芽要求性が解除され、選抜であるATCC9527が生育できない表2に示す培地成分だけからなる人工合成培地によく生育することができる。

表 2

培地成分	濃度(g/L)	培地成分	濃度(g/L)
グルコース	10000	D, L-パントチン酸カルシウム	0.5
L-アラニン	200	リボフラビン	0.5
L-アルギニン	200	チアミン	0.5
L-アスパラギン	200	ナイアシン	1.0
L-アスパラギン酸	200	ピリドキサミン	1.0
L-シスチン	100	ピリドキサール	1.0
L-グルタミン	350	葉酸	0.005
L-グルタミン酸	1000	ピオチン	0.0025
グリシン	400	パラアミノ安息香酸	0.1
L-ヒスチジン	400	NAD	0.5
L-ヒドロキシプロリン	50	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500
L-イソロイシン	200	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14000
L-ロイシン	200	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
L-リジン	200	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10
L-メチオニン	200	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10
L-フェニルアラニン	200	NaCl	10
L-プロリン	200	NaCaH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O(御座ソーダ)	10000
L-セリン	200	NaHCO <sub>3</sub>	500
L-スレオニン	200	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	60
L-トリプトファン	200		
L-チロシン	200		
L-バリン	200		
アサニン	20		
グアニン	20		
ウラシル	20		

## 特開昭63-123392 (4)

ストレプトコッカス・エファム・100の栄養  
要求性は表3に示すとおりである。

栄養素	要求性	栄養素	要求性	栄養素	要求性
炭素源	なし	炭素源	なし	炭素源	なし
グルコース	あり	グルコース	あり	グルコース	あり
フラクトース	あり	フラクトース	あり	フラクトース	あり
ガラクトース	あり	ガラクトース	あり	ガラクトース	あり
シクロデキストリン	あり	シクロデキストリン	あり	シクロデキストリン	あり
デキストリン	あり	デキストリン	あり	デキストリン	あり
麦芽糖	あり	麦芽糖	あり	麦芽糖	あり
乳糖	あり	乳糖	あり	乳糖	あり
スクロース	あり	スクロース	あり	スクロース	あり
トレハロース	あり	トレハロース	あり	トレハロース	あり
マンニトール	あり	マンニトール	あり	マンニトール	あり
ソルビトール	あり	ソルビトール	あり	ソルビトール	あり
キシリトール	あり	キシリトール	あり	キシリトール	あり
リブシロース	あり	リブシロース	あり	リブシロース	あり
アミノ酸	なし	アミノ酸	なし	アミノ酸	なし
ペプチド	あり	ペプチド	あり	ペプチド	あり
核酸	なし	核酸	なし	核酸	なし
ビタミン	なし	ビタミン	なし	ビタミン	なし
ミネラル	なし	ミネラル	なし	ミネラル	なし
微量元素	なし	微量元素	なし	微量元素	なし
成長因子	なし	成長因子	なし	成長因子	なし
その他	なし	その他	なし	その他	なし

特定の栄養素の要求性が解除された菌株を取得するときは、表2の培地から、その栄養素を除いた培地を作成し、上述と同様の操作を行なう。

また栄養要求性が部分的に解除された菌株は、とくに人為的に変異処理を行わなくても、上述のようなえつご操作をくりかえすことにより獲得することもできる。

本発明に用いる培地は通常の微生物の培養に用いるものでよく、グルコース、フラクトース、ガラクトース、スクロース、等の炭素源、リン酸塩1カリウム、リン酸塩2カリウム、硫酸マグネシウム、亜硫酸ソーダ、チオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カゼイン、酵母エキス、コーンステイプリカー、大豆加水分解等の有機栄養源の他、必要に応じて各種アミノ酸、ビタミン類等が好適に用いられる。

これらの培地成分は一括仕込又は分添添加いずとも採用可能である。

本発明の培養は、通気・攪拌培養等の公知の方

法でよく、培養温度は30〜35℃が好ましい。

培養液のpHは、菌の生育と共に低下するため、カゼソーダ、カゼカリ、アンモニウム等のpH調整剤を添加し、pH6.5〜7.0にコントロールする。

このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に、培養液の粘度が次第に上昇してくる。使用炭素源が培養液中で消費された時点で培養を停止し、遠心分離による除菌後、アルコール等の有機溶媒による析出、膜ろ過による濃縮等の簡単な公知精製法により、高収率でヒアルロン酸が得られる。

## 〔実施例〕

次に実施例により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

## 実施例1

グルコース2%、リン酸塩1カリウム0.2%、硫酸マグネシウム7水塩0.05%、チオ硫酸ソーダ0.1%、ポリペプトン1.0%酵母エキス0.5%からなるpH8.5の培養液1ℓに同一培地からなるストレプトコッカス・エファム・100の菌培養

## 特開昭63-123392 (5)

表 3

バッチ数	収量g (培養液1Lあたり)
1	7.2
2	7.1
3	7.0
4	7.3
5	7.1

液10mlを接種し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃でカゼソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2%を分添し、グルコースが全部消費された時点で培養を停止した。

培養液を塩酸でpH4に調整後、蒸留水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエタノールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿をろ取し、2%食塩水に再溶解後、再びエタノールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを真空で減圧乾燥して、培養液1Lあたり7.2gの白色ヒアルロン酸ソーダを得た。

得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトミセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。

上記と同様の培養を4回くりかえし、全部で5バッチ行なった結果を表3に示す。

さらに長期的に培養を行なったが、ヒアルロン酸収量は常に安定していた。

## 比較例1

菌株であるストレプトコッカス・エキATCC 9527を実施例1と同様にして、5回くりかえしたが、得られたヒアルロン酸ソーダはそれぞれ、4.5g、2.3g、3.5g、1.2g、3.9gであり、収量は実施例1に比較して、低く、またばらついていた。

## 〔発明の効果〕

本発明によれば、ヒアルロン酸を高収率で、しかも収量にばらつきなく、安定に生産することが

できる。また菌体管理も容易である。

本発明によつて製造されたヒアルロン酸は、化粧品、医薬品に配合して使用できる。

特許出願人 電気化学工業株式会社